

PCT

世界知的所有権機関
国際事務局

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類 ⁴ G01N 27/28, 27/30		A1	(11) 国際公開番号 WO 89/ 09397
			(43) 国際公開日 1989年10月5日 (05.10.89)
(21) 国際出願番号 PCT/JP89/00337 (22) 国際出願日 1989年3月30日 (30. 03. 89) (31) 優先権主張番号 特願昭63-80829 特願昭63-80842 特願昭63-121002 (32) 優先日 1988年3月31日 (31. 03. 88) 1988年3月31日 (31. 03. 88) 1988年5月18日 (18. 05. 88) (33) 優先権主張国 JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 松下電器産業株式会社 (MATSUSHITA ELECTRIC INDUSTRIAL CO., LTD.) [JP/JP] 〒571 大阪府門真市大字門真1006番地 Osaka, (JP) (72) 発明者: および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 南海史朗 (NANKAI, Shiro) [JP/JP] 〒573 大阪府枚方市茄子作4丁目50-12 Osaka, (JP) 河栗真理子 (KAWAGURI, Mariko) [JP/JP] 〒570 大阪府守口市大町1丁目12-1 藤和守口ヘイタウン202 Osaka, (JP)		藤田真由美 (FUJITA, Mayumi) [JP/JP] 〒570 大阪府守口市橘町3丁目131-85 Osaka, (JP) 飯島孝志 (IIJIMA, Takashi) [JP/JP] 〒573 大阪府枚方市山之西町35-26 Osaka, (JP) (74) 代理人 弁理士 栗野重孝, 外 (AWANO, Shigetaka et al.) 〒571 大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器産業株式会社内 Osaka, (JP) (81) 指定国 AT (欧州特許), BE (欧州特許), CH (欧州特許), DE (欧州特許), FR (欧州特許), GB (欧州特許), IT (欧州特許), LU (欧州特許), NL (欧州特許), SE (欧州特許), US. 添付公開書類 国際調査報告書	
(54) Title: BIOSENSOR AND PROCESS FOR ITS PRODUCTION			
(54) 発明の名称 バイオセンサおよびその製造法			
(57) Abstract			
<p>A biosensor of the invention comprises an insulating base board (1) having formed thereon, in sequence, leads (2, 3, 3'), an electrode system mainly made of carbon (4, 5, 5'), an insulating layer (6) and a reaction layer (14) composed of an enzyme and an electron acceptor, and being provided thereon with a space (8) defined by a spacer (7) and a cover (9). When a biological sample solution is brought into contact with the inlet (10) of the biosensor having the above-described structure, the sample solution is introduced into its inside, while the air within the space (8) is rapidly discharged through the outlet (11) and, at the same time, the space (8) is filled with the sample solution up to the neighborhood of the outlet. Thus, measurement can be conducted inexpensively at a high speed with a high accuracy through simple procedures without residual bubbles.</p>			

(57) 要約

本発明のバイオセンサは、絶縁性の基板（１）上にリード（２，３，３'）、カーボンを主体とする電極系（４，５，５'）をそれぞれ形成し、この上に絶縁層（６）、酵素および電子受容体からなる反応層（１４）を設け、さらに基板（１）上にスペーサ（７）及びカバー（９）により空間部（８）を形成した構成を有している。

得られたバイオセンサの導入口（１０）に生体試料液を接触させると、試料液は内部へ導かれ、空間（８）内の空気は排出口（１１）から速かに排出され、同時に空間（８）は排出口近傍まで試料液で満たされる。

そのため、気泡の残留はなく、安価で簡易な操作で迅速かつ高精度に測定することができる。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第1頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AT	オーストリア	FR	フランス	MR	モーリタニア
AU	オーストラリア	GA	ガボン	MW	マラウイ
BB	バルバドス	GB	イギリス	NL	オランダ
BE	ベルギー	HU	ハンガリー	NO	ノルウェー
BG	ブルガリア	IT	イタリア	RO	ルーマニア
BJ	ベナン	JP	日本	SD	スーダン
BR	ブラジル	KP	朝鮮民主主義人民共和国	SE	スウェーデン
CF	中央アフリカ共和国	KR	大韓民国	SN	セネガル
CG	コンゴ	LI	リヒテンシュタイン	SU	ソビエト連邦
CH	スイス	LK	スリランカ	TD	チャード
CM	カメルーン	LU	ルクセンブルグ	TC	トーゴ
DE	西ドイツ	MC	モナコ	US	米国
DK	デンマーク	MG	マダガスカル		
FI	フィンランド	ML	マリ		

明 細 書

発明の名称

バイオセンサおよびその製造法

技術分野

- 5 本発明は、種々の生体試料液中の特定成分を高精度で、迅速かつ容易に定量することのできるバイオセンサおよびその製造法に関するものである。

背景技術

- 近年、酵素の有する特異的触媒作用を利用した種々のバイオ
10 センサが開発され、特に臨床分野への応用が試みられている、検査項目及び検体数が増加している現在、迅速に精度よく測定できるバイオセンサが望まれている。

- グルコースセンサを例にとると、糖尿病の増加が著しい今日、
血液中の血糖値を測定し管理するには、従来のように血液を遠
15 心分離して血漿を測定するのでは非常に時間を要するため、全血で測定できるセンサが要求されている。簡易型としては、尿検査の時に使用されている検査紙と同様に、スティック状の支持体に糖（グルコース）にのみ反応する酵素と、酵素反応時または酵素反応の生成物により変化する色素とを含有する担体を
20 設置したものがある。この担体上に血液を滴下し、一定時間後の色素の変化を目視または光学的に測定する方式であるが、血液中の着色物による妨害が大きく精度は低い。

- そこで、第1図のような多層式の分析担体が提案されている
（実開昭54-178495号公報）。これは透明な支持体5
25 1の上に試薬層52、展開層53、防水層54、濾過層55が

順に積層された構造となっている。血液サンプルを上部から滴下すると、まず濾過層 5 5 により血液中の赤血球、血小板などの固形成分が除去され、防水層 5 4 にある小孔 5 6 から展開層 5 3 へ均一に浸透し、試薬層 5 2 において反応が進行する。反応終了後、透明な支持体 5 1 を通して矢印の方向から光を照射し、比色分析により基質濃度を測定する方式である。従来の簡易なスティック状の担体と比較すると複雑な構造であるが、血球除去などにより精度は向上した。しかし、血液の浸透および反応に時間がかかるため、サンプルの乾燥を防ぐ防水層 5 4 を必要とし、また、反応を速めるために高温でのインキュベーションを要するなど、装置および担体が複雑化するという問題がある。

一方、血液などの生体試料中の特定成分について、試料液の希釈や攪拌などの操作を行なうことなく高精度に定量する方式としては、第 2 図に示すようなバイオセンサが提案されている（例えば、特開昭 5 9 - 1 6 6 8 5 2 号公報）。このバイオセンサは、絶縁基板 6 3 にリード 6 1、6 2 を各々有する白金などからなる測定極 6 4 および対極 6 5 を埋設し、これらの電極系の露出部分を酸化還元酵素および電子受容体を担持した多孔体 6 6 で覆ったものである。試料液を多孔体上へ滴下すると、試料液中に酸化還元酵素と電子受容体が溶解し、試料液中の基質との間で酵素反応が進行し、電子受容体が還元される。反応終了後、この還元された電子受容体を電気化学的に酸化し、このとき得られる酸化電流値から試料中の基質濃度を求める。

しかし、このような構成では、多孔体については測定毎に取り替えることにより簡単に測定に供することができるが、電極

については洗浄等の操作が必要である。一方、電極系をも含めて測定毎の使い捨てが可能となれば、測定操作上、極めて簡易になるものの、白金等の電極材料や構成等の面から、非常に高価なものにならざるを得ない。また白金電極の構成方法として、

5 スパッタ法や蒸着法を用いることもできるが、製造上高価なものとなる。

また、電極系をも含めて使い捨てにし得る方式としては、特開昭61-294351号公報に記載のバイオセンサを提案した。このバイオセンサは、第3図に示すように絶縁性の基板7

10 1の上にスクリーン印刷等の方法でカーボンなどからなる電極系72(72')、73(73')、74(74')を形成し、絶縁層75を設けた後、電極系の上を酸化還元酵素と電子受容体を担持した多孔体77で覆い保持枠76とカバー78で全体を一体化したものである。試料液を多孔体上へ滴下すると、多

15 孔体に担持されている酸化還元酵素と電子受容体が試料液に溶解し、試料液中の基質との間で酵素反応が進行し電子受容体が還元される。反応終了後、この還元された電子受容体を電気化学的に酸化し、このとき得られる酸化電流値から試料液中の基質濃度を求める。

20 以上の様な従来の構成では、電極系を含む基板面の濡れが必ずしも一様とならないため、多孔体と基板との間に気泡が残り、応答電流に影響を与えたり反応速度が低下する場合があった。

また、周囲の湿度が低いときには測定中に試料液の水分が蒸発し、応答の変動が見受けられた。さらに、試料液中に電極に吸

25 着しやすい物質やアスコルビン酸などの酸化されやすい物質が

存在すると、センサの応答に影響が見受けられた。

そこで、血液などの生体試料中の特定成分を簡易かつ迅速、高精度に測定するためのセンサとしては、微量の試料液を予め希釈あるいは定量することなく単にセンサに添加するだけで測定値が得られるものが望まれる。さらには、洗浄、拭き取りなどの操作を伴わない、ディスポーザブルタイプのものが望まれる。

発明の開示

本発明のバイオセンサは、絶縁性の基板上に少なくとも測定極と対極からなる電極系と該電極系の上に酵素と電子受容体を含む反応層を設け、さらにカバーと一体化することにより、該反応層を含む空間部を形成し、前記空間部に被検液を導入する導入口と前記空間部の気体を前記被検液の流入によって排出する排出口を設け、前記酵素と前記被検液の反応に際しての物質濃度変化を前記電極系で検知し、前記被検液中の基質濃度を測定するものである。

また、電極系を複数組の電極系から構成し、これら複数組の電極系に各々対応した反応層を設けることにより独立したセンサ系を構成することができる。これにより、2種以上の基質濃度を同時に測定することができる。また、2組の電極系を用い、一方の電極系を測定用に、他方の電極系をブランク用に用い、両電極系の応答差を求めることにより、アスコルビン酸などによる妨害を除去することができる。

また、基板と電極系と反応層およびカバーを一体化して空間部を設け、該空間部を構成する部材の表面を親水性とすること

により、微量の試料液にセンサの導入口を接するだけの簡易な操作で上記空間部内に一定量の試料液を速やかに導入することができる。

導入された試料液は、反応層の電子受容体や酵素、親水性高分子を溶解し粘調な液となりながら酵素反応が進行する。酵素反応により試料液中の基質濃度に対応した還元型の電子受容体が生成する。次に、この還元型の電子受容体を測定極上で電気化学的に酸化することにより、その酸化電流値から基質濃度を知ることができる。

10 本発明のバイオセンサにおいては、親水性高分子を用いることにより、血液サンプル中の赤血球など、固形成分の電極への影響を防止することができるとともに、さらに、空間部を設けることにより電極上の液の流動を効果的に防止することができるため、測定中の振動による影響を防止できる。

15 一方、本発明のバイオセンサの反応層は、酵素層さらにはこの上に設けた電子受容体層から構成されるが、さらにこれら両層の間に親水性高分子層を設けることにより酵素と電子受容体を分離し、保存性に優れたバイオセンサを提供するものである。

本発明によれば、電極系をも含めたディスポーザブルタイプの
20 のバイオセンサを構成することができ、試料中の基質濃度、たとえば血液中のグルコース濃度について、予め試料の希釈や定量をすることなく、極めて微量の試料液を添加するだけの簡易な操作で迅速かつ高精度に測定することができる。

図面の簡単な説明

25 第1図は従来のグルコースセンサの一例を示す模式図、第2

図および第3図は従来例の酵素電極を用いたグルコースセンサの模式図、第4図は本発明の一実施例であるバイオセンサの分解斜視図、第5図はその外観図、第6図はその断面模式図、第7図はバイオセンサの応答特性図、第8図は別の実施例であるバイオセンサの分解斜視図、第9図はその外観図、第10図、第12図および第13図は本発明の別の実施例であるバイオセンサの分解斜視図、第11図は従来例の別の実施例であるバイオセンサの分解斜視図、第14図はアスコルビン酸濃度と応答特性の関係図、第15図はフェリシアン化カリウムの粒径と反応終了時間の関係図である。

発明を実施するための最良の形態

実施例1

以下の実施例の説明用図面において、共通する要素には同一番号を付し、一部説明を省略する。

15 バイオセンサの一例として、グルコースセンサについて説明する。第4図は本発明のバイオセンサの一実施例として作製したグルコースセンサの分解斜視図であり、第5図はその外観図、また第6図は、第5図に示すバイオセンサを長手方向に中央部で切断した場合の断面図である。なお、第4図には、第6図に
20 示す反応層14は示されていない。

以下に、センサの作製方法について説明する。ポリエチレンテレフタレートからなる絶縁性の基板1に、スクリーン印刷により銀ペーストを印刷しリード2、3(3')を形成する。次に、樹脂バインダーを含む導電性カーボンペーストを印刷し、
25 加熱乾燥することにより、測定極4、対極5(5')からなる

電極系を形成する。さらに、電極系を部分的に覆い、電極の露出部分の面積を一定とし、かつリードの不要部を覆うように絶縁性ペーストを印刷し、加熱処理をして絶縁層 6 を形成する。

次に、電極系 4、5 (5') の露出部分を研磨後、空气中で
5 100℃にて4時間熱処理を施した。このようにして電極部分を構成した後、親水性高分子として、カルボキシメチルセルロース (以下 CMC と略す) の 0.5 wt% 水溶液を電極上へ展開、乾燥し CMC 層を形成する。そしてこの CMC 層を覆うように、
10 酵素としてグルコースオキシダーゼ (GOD) をリン酸緩衝液に溶解したものを展開し、乾燥させ、CMC-GOD 層からなる反応層 14 を形成した。この場合、CMC と GOD は部分的に混合された状態で厚さ数ミクロンの薄膜状となっている。

次に、この基板 1 と樹脂板からなるスペーサ 7 とカバー 9 の 3 つの部材について、第 4 図に示す様に、各部材間が破線で示す位置関係になるように接着し、第 5 図の外観図に示すように
15 一体化した。ここで、スペーサは約 300 μ m の厚みを有し、その中央部を幅 2 代、長さ 7 mm の U 型に切りとった形状をしており、切りとられた部分の端部は一体化したときに試料液の導入口 10 となり、中央部は空間部 8 を形成する。また、カバ
20 - 9 は直径 2 代の穴を有しており、一体化したときに排出口 11 となる。

上記のように構成したグルコースセンサの先端の導入口を試料液であるグルコース標準液 (200 mg/dl) に接触させると、試料液は導入口 10 より内部へ導かれる。このとき空間
25 部 8 内の空気は排出口 11 から速やかに排出され、同時に空間

部は排出口近傍まで試料液で満たされた。このように試料液は電極面上を速やかに拡がり空間部を満たすため、気泡の残留は認められなかった。

これは、導入口と排出口を設けることにより試料液の流れが
5 一方向となり、また、電極上に予め形成された親水性高分子層により電極面の濡れが向上し、気液の交換が円滑に行なわれることによるものと考えられる。

さらに、カバーやスペーサなど、空間部を構成する部材の表面を界面活性剤で予め処理して親水性とすることにより、さら
10 に円滑な試料液の導入が可能であった。

一方、添加された試料液はCMCを溶解し粘調な液体となり、試料液中のグルコースは電極上に担持されたグルコースオキシ
ダーゼの作用で酸素と反応して過酸化水素を生成する。そこで、
試料液を導入して1分後に電極間に1Vの電圧を印加すること
15 により、測定極をアノード方向へ分極した。上記のアノード方向への電圧印加により、生成し過酸化水素の酸化電流が得られた。この電流値は基質であるグルコースの濃度に対応する。

上記構成になるセンサの応答特性の一例として、電圧印加5秒後の電流値とグルコース濃度との関係を第7図Aに示すが、
20 良好な応答特性が得られた。

また、上記と同一仕様のグルコースセンサ30個について同じ試料液で試験したところ、変動係数は約5%と良好であった。

さらに、第3図に示す従来例の構成で試作したグルコースセンサとともに、湿度が30%と80%の条件下で、蒸発による
25 影響についてそれぞれ10個のセンサを用いて比較検討したと

ころ、本発明になるグルコースセンサにおいては5分放置後においてもその影響は無視し得るものであったが、従来構成のものについては低湿度の方が2分後において約3%高値を示した。

以上のように、本発明になる上記構成のグルコースセンサは、
5 微量の試料液をすみやかに反応層領域へ吸入し、周囲の湿度等による影響を受けることなく、簡易、迅速かつ高精度にグルコース濃度を測定することができる。

実施例 2

CMC-GOD層を形成するまでは実施例1と全く同様に作
10 製した後、さらに以下に示す方法でCMC-GOD-電子受容体層からなる反応層を形成した。

トルエンに界面活性剤としてレシチン（ホスファチジルコリン）を溶解して1wt%溶液を調製し、これに電子受容体としてフェリシアン化カリウムの微結晶（平均粒径10 μ m以下）
15 をたものを分散し、得られた分散液をCMC-GOD層上へ展開した。この後、トルエンを蒸発させて、CMC-GOD-電子受容体層からなる反応層を電極系上に形成し、さらに実施例1と同様にしてスペーサ、カバーとともに一体化し、第5図に示す構造のグルコースセンサとした。

20 次に、前記同様にしてセンサ先端部分よりグルコース標準液を導入し、約1分後に両極間に600mVの電圧を印加することにより、酵素反応で生成したフェロシアン化カリウムを測定極で酸化し、このときの電圧印加5秒後の電流値を測定した。

この結果、第7図Bに示す様にグルコース濃度と応答電流値の
25 間に極めて良好な直線関係が得られた。また、30個のセンサ

を用いて変動係数を調べたところ、グルコース標準液について 2.6%、全血試料について3%と極めて良好な値を示した。また、蒸発の影響について実施例1と同様に試験したところ、前記同様の効果が得られた。

- 5 上記実施例において、レシチンの濃度が0.01wt%以上になるとフェリシアン化カリウムがうまくトルエン中で分散するため滴下が容易となり、薄膜状のフェリシアン化カリウム-レシチン層が形成できた。レシチンがない場合は、フェリシアン化カリウム層が不均一に形成されたり基板を曲げるとはがれると
- 10 いう欠点が見られたが、レシチンを添加することにより均一ではがれにくいフェリシアン化カリウム層が容易に形成できた。レシチンの濃度が高くなるとともに、フェリシアン化カリウム層がはがれにくくなるが、フェリシアン化カリウムの溶解速度も落ちるため、0.01-3wt%が適当と考えられる。レシチンの
- 15 かわりにポリエチレングリコールアルキルフェニルエーテル（商品名：トリトンX）を用いたところ、フェリシアン化カリウムの微粒子をトルエン中に分散させるためには0.1%以上必要であったが、レシチンと同様に良好なフェリシアン化カリウム層が形成できた。界面活性剤としては、前記の例の他に、オレイ
- 20 ン酸やポリオキシエチレングリセリン脂肪酸エステルやシクロデキストリンなど、電子受容体を有機溶媒に分散させ、かつ酵素活性に影響をおよぼさないものであれば、特に制限されることはない。また、電子受容体を混合する有機溶媒としては、トルエンや石油エーテルなど、GOD活性および印刷電極への影
- 25 響の少ないものであればよい。

上記に用いたフェリシアン化カリウム微結晶の粒径については、市販のフェリシアン化カリウムの結晶を粉碎し、ふるいにより所定の粒径のものを集めてフェリシアン化カリウム層を形成し、各種の粒径のもので作成した前記同様のグルコースセンサについて応答を比較した。第15図は、横軸にふるいのメッシュの大きさ、縦軸にグルコース400mg/dlに対する反応終了時間を示した。()の中は穴の径(μm)を表わしている。第15図に示すように細かい粒径の方が速やかに溶解反応終了に必要な時間が短かった。145メッシュ(日本工業規格)を通過したフェリシアン化カリウム(粒径100 μm 以下)で作製したセンサは、2分以内に反応が終了した。さらに、フェリシアン化カリウム層を作製するとき粒径が小さい方が均一に膜ができ応答のばらつきが少なかった。フェリシアン化カリウムの微結晶は粉碎でも作製できるが、フェリシアン化カリウムの水溶液をエタノール中で再結晶させると簡易に10 μm 以下の粒径が作成でき、フェリシアン化カリウム層を形成させると密な膜となり、反応終了時間も短縮できた。

100 μm 以下に微粒化したフェリシアン化カリウムをトルエンに混ぜて滴下すると、トルエンがすみやかに気化し、微粒子のままのフェリシアン化カリウム層が形成でき、溶解速度も速く迅速に測定できた。さらに有機溶媒を用いることにより、CMC-GOD層の上にフェリシアン化カリウムの層を分離して形成でき、保存性を向上することができた。

上記実施例において、導入口及び排出口を設けるにあたっては、第4図～第6図に示した配置以外に、第8図の分解斜視図

および第 9 図の外観図に示すように、カバー 9 と基板 1 にそれぞれ穴を設けて導入口 10 と排出口 11 としてもよい。

また、第 10 図の分解斜視図に示すように、スペーサを 7 と 7' の 2 つに分けることにより、空間部 8 と導入口 10 及び排出口 11 とすることもできる。

さらに、第 5 図に示す構造のバイオセンサの先端部分の形状を変えて、丸みを持つようにしたものについて、その外観図を第 11 図に示す。こうすることにより、試料液を導入するにあたって接液する部分がほぼ導入口 10 に限定されるため、導入口 10 周囲に試料液の回り込みがなく、さらに少量の試料液に対しても円滑に導入することができた。

実施例 3

実施例 1 と同様の方法により、第 12 図に示す電極部を構成した。すなわち、基板上に銀リード 3、21、22、23 とこれらに対応する対極 5 及び 3 ケの測定極 41、42、43 を形成することにより、対極を共有する 3 組の電極系を構成した。次に、各々の測定極近傍に実施例 2 と同様にして CMC-GOD-フェリシアン化カリウム層からなる反応層を形成した。

次に、スペーサおよびカバーを実施例 1 と同様に接着して一体化した。ここで、スペーサはその一部が「くし状」に切りとられており、この切りとられた部分が空間部 8 を形成している。この空間部はそれぞれの電極系上に分割されているが、全体としては連続しており、共通の空間部となっている。また、端部は導入口 10 となる。

これらの各電極系上に分割されて構成された空間部に対応し

て、カバー 9 には 3 個の穴をあけ排出口 11、12、13 を設けている。導入口 10 を試料液に接触させると、3 個の排出口より空間部内の空気が排出されながら試料液は空間部内へ速やかに導入される。

- 5 実施例 2 と同様にして、グルコース標準液に対する応答を 3 個の電極系について測定し、その平均値を求めて 1 個のセンサの応答値とした。これを、30 個の同一仕様のグルコースセンサにつき試験したところ、変動係数は 2 % と良好な値を示した。

ディスポーザブルタイプのセンサにおいては、各センサ毎の
10 電極面積などの差異をはじめとする誤差要因をいかに小さくするかが信頼性向上において重要である。これらセンサ間の差異は同一試料液に対する測定値の差を生ずる原因となっている。しかしながら、上記のように、同一センサに複数の電極系を設け、その応答値の平均値を得ることにより、より高精度な測定
15 を迅速に行なうことができる。

第 12 図には 3 組の電極を有する例について示したが、これに限定されることはなく、さらに多数の電極系を設置することが可能である。また空間部の形状については、電極系の形状や配置も同様であるが、図示したものに限定されるものではない。

20 実施例 4

第 13 図に複数の電極系を有する構成の変形例を示す。すでに述べた実施例 1 と同様の方法で、基板上に銀リード 21、22、3 とこれらに対応する測定極 41、42 と共通の対極 5 からなる 2 組の電極系を構成した。次に、実施例 2 と同様にして、
25 CMC-GOD-フェリシアン化カリウム層からなる反応層を

各々の電極系上へ形成した後、スペーサ7とカバー9を接着した。ここでスペーサは独立した空間部81、82となる2ヶの穴を有しており、これに対応する排出口11、12と共通の導入口10がカバーに設けてある。

- 5 上記構成のグルコースセンサについて、実施例3に述べたと同様に、グルコース標準液に対する2組の電極系の応答値を平均して1個のセンサの測定値とし、30個の同一仕様のセンサについて試験したところ、変動係数は2.2%と良好であった。

この様に、第13図に示すセンサにおいては、より高精度な
10 測定ができるほか、独立した空間部を有しているので、1個のセンサで異なる試料液、あるいは時間や温度等の異なる条件下での測定に供することもできる。

上記においては、カバーに1個の穴を設けて共通の導入口としたが、この構成に限定されることはない。複数組の電極系と
15 複数の独立した空間部からなる測定系を構成することが重要な点であり、2個の穴を設けて、それぞれの空間部に対する導入口を構成することもできる。

実施例5

第13図に示す構成の電極部、スペーサ、カバーを用いて以
20 下に述べるグルコースセンサを構成した。まず、測定極41の上には実施例1と同様にしてCMC-GODからなる反応層を形成した。一方、測定極42の上にはCMC層のみを形成した。

上記の様にして得られた2組の電極系を有するグルコースセンサについて、種々の濃度のアスコルビン酸を含むグルコース
25 標準液(200mg/dl)を導入口10に滴下し、各々の電

極系の上へ導いた。次に、実施例 1 と同様に、滴下後、約 1 分後に 1 V の電圧を印加し、5 秒後の電流値を測定した。結果を第 14 図に示す。CMC-GOD 層の電極系の出力を A で、また、CMC 層だけの電極系の出力（ブランク出力）を B でそれぞれ示す。図より明らかなように、A の出力はアスコルビン酸の濃度増加とともに増大し、一方 B の出力も同様な増加がみられる。これはアスコルビン酸に対する各々の電極系の感度がほぼ等しいことを示している。これより、両電極系の出力の差（ $A - B$ ）を検出するとグルコースに基く電流値が得られる。すなわち、2 組の電極系を用いることにより電極活性な物質による誤差を大幅に低減することができる。この様な効果はアスコルビン酸以外にも、尿酸などについても認められた。

この様に、2 組の電極系を設け、一方の電極系に親水性高分子-酵素層、他方の電極系に親水性高分子層だけを形成して、センサを構成することにより、妨害物質を含む試料液中の基質濃度を精度よく測定することができた。

上記において、両方の電極系に CMC-GOD 層を形成した後、一方の電極系についてのみレーザ照射による局部加熱、紫外線照射などを施すことにより GOD を失活させて、ブランク出力用の電極系とすることもできる。こうすると酵素活性以外は両電極系の構成が同一となり、両電極系の妨害物質による出力電流をさらによく一致させることができ、センサ検出精度を向上することができる。

また、以上の実施例においては電極部分が測定極と対極の 2 電極からなる電極系について述べたが、電極系を銀/塩化銀を

加えた 3 電極から構成することにより、さらに精度を向上することができる。電極系を構成する方法の一例としては、3 本の銀リードを基板上に印刷した後、2 本のリード先端部の上だけにカーボンペーストを印刷し、絶縁層をコートした後、銀が露
5 出している残り 1 本のリード先端部について、その表面を処理して塩化銀を形成し、銀/塩化銀電極とするなどにより構成することができる。

実施例 6

実施例 5 において、測定極 4 1 の上に実施例 2 と同様にして
10 CMC-GOD-フェリシアン化カリウムからなる反応層を、また測定極 4 2 の上に CMC-フェリシアン化カリウムからなる層をそれぞれ形成した。測定は、印加電圧を 0.6 V とした以外は実施例 5 と同様に行なったところ、前記同様にアスコルビン酸の影響を除去することができた。

15 実施例 7

実施例 5 において、測定極 4 1 の上に実施例 2 と同様にして CMC-GOD-フェリシアン化カリウムからなる反応層を形成した。また測定極 4 2 の上には、CMC 層を形成した後、グルコースオキシダーゼとムタロターゼおよび β -グルコシダー
20 ゼからなる酵素層を形成し、さらにフェリシアン化カリウムからなる電子受容体層を形成して反応層とした。測定は、印加電圧を 0.6 V とし、試料液としてグルコースとショ糖（スクロース）を含む水溶液を用いたところ、測定極 4 1 においてはグルコース濃度に対応した電流が得られ、また、測定極 4 2 にお
25 いてはグルコースとスクロースの合計濃度に対応した電流が得

られた。これらの電流値の差からスクロース濃度を測定できた。
このようにして、2種類の基質濃度を測定することができる。

実施例 8

- 実施例 1 と同様にして電極部分を作成した後、親水性高分子
5 として、カルボキシメチルセルロース（以下 CMC と略す）の
0.5 wt% 水溶液を電極系上へ展開、乾燥し CMC 層を形成す
る。次に、この CMC 層を覆うように、グルコースオキシダー
ゼ水に溶解したものを展開し、乾燥させ、CMC-GOD 層を
形成した。この場合、CMC と GOD は部分的に混合された状
10 態で厚さ数ミクロンの薄膜状となっている。さらに、この CM
C-GOD 層からなる第 1 の層上を完全に覆うようにして、ポ
リビニルピロリドン（以下 PVP と略す）の 0.5% エタノー
ル溶液を展開し、乾燥させ、PVP 層からなる第 2 の層を形成
した。この PVP 層の上へ、界面活性剤であるレシチンの 1%
15 トルエン溶液中に電子受容体であるフェリシアン化カリウムの
微結晶を混ぜたものを滴下、展開し、乾燥させることによって
フェリシアン化カリウム-レシチン層からなる第 3 の層を形成
した。そして、実施例 1 と同様にスペーサ、カバーとともに一
体化した。
- 20 このフェリシアン化カリウム-レシチン層を形成する際の溶
媒として PVP が難溶性を示すトルエンを用いることによって、
フェリシアン化カリウム-レシチン溶液を PVP 層上に一様に
広げることが可能となり、その結果、均一なフェリシアン化カ
リウム-レシチン層を得ることができた。
- 25 このように電子受容体と界面活性剤を展開する際の溶媒とし

て、第2層を構成する親水性高分子が難溶性を示す溶媒を用いると、極めて均一性の高い電子受容体層（第3の層）を形成することができた。

上記のようにして構成したグルコースセンサに試料液として
5 グルコース標準液を導入口から加え、1分後に測定極にアノード方向へ+0.6Vのパルス電圧を印加し、5秒後の応答電流を測定したところ、900mg/dl以上という高濃度まで良好な直線関係が得られた。上記のグルコースセンサに血液サンプルを5μl滴下して1分後の応答電流を測定したところ非常に再現
10 性のよい応答が得られた。

上記の方法で作成したグルコースセンサと、該グルコースセンサのうち親水性高分子からなる第2の層を設けなかったものの2種類について、乾燥状態で35℃、30日間の保存試験を行なった。試料液としてグルコース標準液（90mg/dl）を用い
15 て30日後のセンサ応答を比較したところ、親水性高分子からなる第2の層を設けなかったものについてのCV値は5.3となったが、PVPからなる第2の層を設けたもののCV値は2.5と極めて良好な値が得られた。

実施例9

20 実施例8と同様にしてCMC-GOD層、およびPVP層を形成した。このPVP層の上へ、界面活性剤であるレシチンの0.5%エタノール溶液中に電子受容体としてフェリシアン化カリウムの微結晶を混ぜたものを滴下、展開し、乾燥させることによってフェリシアン化カリウム-レシチン層を形成した。
25 このフェリシアン化カリウム-レシチン層を形成する際の溶媒

としてPVPが容易に溶解するエタノールを用いることによって、フェリシアン化カリウム-レシチン層をPVP層上の一点に集中的に展開することができた。すなわち、センサの測定電極上に集中して均一なフェリシアン化カリウム-レシチン層を
5 構成することが可能となり、必要とされる最小量を展開するだけで安定な応答が得られるセンサを作成することができた。

上記のようにして構成したグルコースセンサのグルコース標準液に対する応答特性を実施例8と同様にして測定したところ、900mg/dl以上という高濃度まで良好な直線関係が得られた。
10 また、血液を試料液として用いた場合にも非常に再現性のよい応答が得られた。さらに、実施例8と同様にして親水性高分子からなる第2の層を設けたものと設けなかったものについて、乾燥状態で35℃、30日間の保存試験を行なったところ、30日後の応答はPVPからなる第2の層を設けたものは極めて
15 良好なCV値が得られた。

従来の構成では、センサが作成された時点ですでにGOD-CMC層とフェリシアン化カリウム-レシチン層とが接触していたため、保存性能を高めることが難しかった。前記実施例8および本実施例9で用いたPVPからなる親水性高分子層は、
20 乾燥状態においてGOD-CMC層とフェリシアン化カリウム-レシチン層とを完全に分離する役目を果たしている。

さらに、この親水性高分子層は試料液中に電極に吸着しやすい物質や電極活性な物質が存在する場合においても、安定なセンサ応答を確保するのに極めて有効である。血液を試料液として
25 て前記グルコースセンサでグルコース濃度を測定した場合にも、

試料液の粘度等に拘らず安定したセンサ応答が得られた。

以上に述べた実施例 1～9 においては、空間部につながる導入口と排出口については、その好適な位置関係の一例を実施例として図示したものであり、排出口を導入口として、また導入口を排出口として用いてもよい。さらに、各々の図に示したスペーサおよびカバーは独立した部材からなっているが、これに限定されることはない。成形などによりスペーサの形状をカバーに持たせたカバーだけの一体部材とすれば量産上有利である。

10 また上記、空間部を構成する部材表面を親水性とすることにより、導入口からの試料液の導入がより円滑となった。この効果は親水性の材料を用いるか、あるいは、空間部を構成する部材の表面を予め界面活性剤で処理し親水性としたときに得られた。

15 一方、基板とカバーの間隔は、スペーサの厚みあるいはこれに相当する部分の寸法を変えることによって調節することができるが、大きすぎると空間部を満たすに要する試料液が多くなり、また毛管現象による液導入にも支障をきたす。また、間隔が小さすぎると、電極間の抵抗の増大や電流分布の乱れを生ず
20 る。以上の点から、間隔としては 0.05～1.0 倍が適当であり、さらに好ましくは 0.1～0.5 倍である。

実施例においては、親水性高分子として CMC を用いたが、その役割は、すでに述べたように試料液の円滑な導入の他に、試料液に含まれる吸着性物質が電極へ吸着し応答に影響するのを
25 を防止することにある。さらには、酵素層と電子受容体層を親

水性高分子層で分離することにより保存性をさらに向上することにある。親水性高分子としてはCMCの他にゼラチンやメチルセルロースなども使用でき、デンプン系、カルボキシメチルセルロース系、ゼラチン系、アクリル酸塩系、ビニルアルコール系、
5 ビニルピロリドン系、無水マレイン酸系のものが好ましい。これらの吸水性あるいは水溶性の親水性高分子を適当な濃度の溶液にしたものを塗布、乾燥することにより、必要な膜厚の親水性高分子層を形成することができる。

なお、以上の実施例においては電極部分が測定極と対極の2
10 電極からなる電極系について述べたが、電極系を参照極を加えた3電極から構成することにより、さらに精度を向上することができる。また、電極材料としては、実施例に示したカーボンは安定で安価な材料として適しているが、これに制限されることはなく、他の貴金属材料や酸化物材料を用いてもよい。

15 また、電子受容体としては、実施例に示したフェリシアン化カリウムは安定性や反応速度の点で優れたものであるが、これ以外に、例えばキノン系化合物やフェロセン系化合物などのレドックス化合物を用いることもできる。

さらに、酸化還元酵素としては上記実施例に示したグルコースオキシダーゼに限定されることはなく、アルコールオキシダーゼやコレステロールオキシダーゼなど種々の酵素を用いることができる。

産業上の利用可能性

本発明のバイオセンサは、種々の生体試料中の特定成分を、
25 迅速に精度よくかつ簡易に測定できるため、臨床検査において

その利用価値は非常に大きい。

5

10

15

20

25

請 求 の 範 囲

1. 電極系と反応層を有する基板上に前記反応層を含む空間部を形成し、前記空間部に被検液を導入する導入口と、前記空間部の気体を前記被検液の流入によって排出する排出口を設けて
- 5 なり、前記電極系は少なくとも測定極と対極を備え、前記反応層には少なくとも酵素を担持してなり、前記酵素と前記被検液の反応に際しての物質濃度変化を前記電極系で検知し、前記被検液中の基質濃度を測定するバイオセンサ。
2. 請求の範囲第1項において、電極系が複数組の電極系から
- 10 なり、前記複数組の電極系に各々対応した反応層と、共通の空間部を有しているバイオセンサ。
3. 請求の範囲第1項において、電極系が複数組の電極系からなり、前記複数組の電極系に対応した反応層と空間部を各々有しているバイオセンサ。
- 15 4. 請求の範囲第1項において、絶縁性の基板上に少なくとも測定極と対極からなる電極系を形成し、前記電極系の表面に反応層を形成してなり、前記反応層が、酸化還元酵素と親水性高分子からなる酵素層とその上部に形成した電子受容体層からなるバイオセンサ。
- 20 5. 請求の範囲第1項において、絶縁性の基板上に少なくとも測定極と対極からなる電極系を形成し、前記電極系の表面に反応層を形成してなり、前記反応層が、酸化還元酵素と親水性高分子からなる酵素層と、その上部に形成した界面活性剤を含有した電子受容体層からなるバイオセンサ。
- 25 6. 請求の範囲第4項または第5項において、電子受容体層が、

粒径が $100\mu\text{m}$ 以下の電子受容体の微粒子からなることを特徴とするバイオセンサ。

7. 請求の範囲第4項または第5項において、親水性高分子が、
5 デンプン系、カルボキシメチルセルロース系、ゼラチン系、ア
クリル酸塩系、ビニルアルコール系、ビニルピロリドン系、無
水マレイン酸系から選択されたいずれかもしくはそれらの混合
物からなるバイオセンサ。

8. 請求の範囲第1項において、空間部を構成する部材の表面
が親水性を有してなるバイオセンサ。

10 9. 請求の範囲第2項または第3項において、電極系が、カー
ボンを主体とする少なくとも測定極と対極からなる2組の電極系
からなり、一方の電極系上に親水性高分子と酸化還元酵素から
なる反応層を備え、他方の電極系上に親水性高分子層あるいは
親水性高分子と失活させた酸化還元酵素からなる層を備えたこ
15 とを特徴とするバイオセンサ。

10. 請求の範囲第2項または第3項において、電極系が、カー
ボンを主体とする少なくとも測定極と対極からなる2組の電極
系からなり、一方の電極系上に親水性高分子と酸化還元酵素と
電子受容体からなる反応層を備え、他方の電極系上に親水性高
20 分子層と電子受容体からなる層を備えたことを特徴とするバイ
オセンサ。

11. 請求の範囲第9項または第10項において、電極系が、
カーボンを主体とする測定極と対極および銀/塩化銀参照極か
らなる参照極であるバイオセンサ。

25 12. 請求の範囲第1項において、電極系が、絶縁性の基板上

にスクリーン印刷で形成されたカーボンを主体とする材料からなるバイオセンサ。

13. 請求の範囲第1項において、絶縁性の基板上に、少なくとも測定極と対極からなる電極系を形成し、前記電極系上に反応層を設けてなり、前記反応層が親水性高分子と酸化還元酵素からなる第1の層と親水性高分子からなる第2の層および電子受容体を含む第3の層からなることを特徴とするバイオセンサ。

14. 請求の範囲第13項において、第1の層及び第2の層の親水性高分子がセルロース系、ビニルピコリドン系、ゼラチン系、アクリル酸塩系、ビニルアルコール系、デンプン系、無水マレイン酸系、アクリルアミド系、メタクリレート樹脂から選ばれたものであるバイオセンサ。

15. 絶縁性の基板上に少なくとも測定極と対極からなる電極系を形成し、前記電極系上に、親水性高分子水溶液および酸化還元酵素水溶液を塗布した後、乾燥して酵素層を形成し、電子受容体と有機溶媒の混合物を前記酵素層の上に展開し有機溶媒を除去して電子受容体層を形成させて反応層を形成し、次にカバーとともに一体化するバイオセンサの製造法。

16. 絶縁性の基板上に、少なくとも測定極と対極からなる電極系を設けた後、前記電極系上に親水性高分子水溶液および酸化還元酵素水溶液を塗布した後、乾燥して酵素層を形成し、次に親水性高分子の有機溶媒溶液を前記酵素層上に展開して親水性高分子層を形成し、さらに電子受容体の有機溶媒分散液を親水性高分子層の上に展開して電子受容体層を形成し、次にカバーとともに一体化するバイオセンサの製造法。

17. 請求の範囲第15項または第16項において、電子受容体と界面活性剤と有機溶媒の混合物を前記酵素層の上に展開し有機溶媒を除去して電子受容体層を形成させるバイオセンサの製造法。

- 5 18. 請求の範囲第17項において、電子受容体層が、粒径が $100\mu\text{m}$ 以下の電子受容体の微粒子からなることを特徴とするバイオセンサの製造法。

10

15

20

25

- 1/14 -

FIG. 1

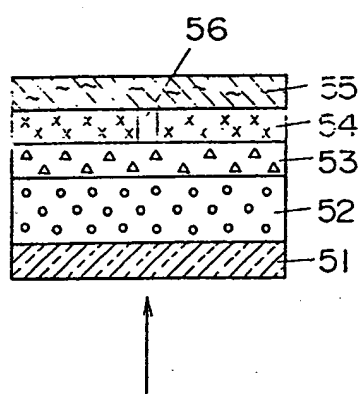
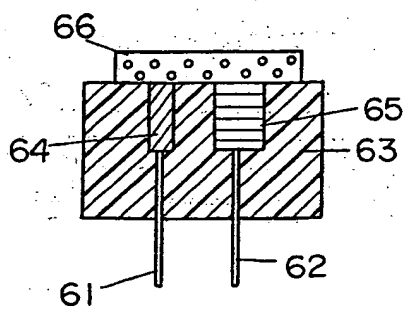
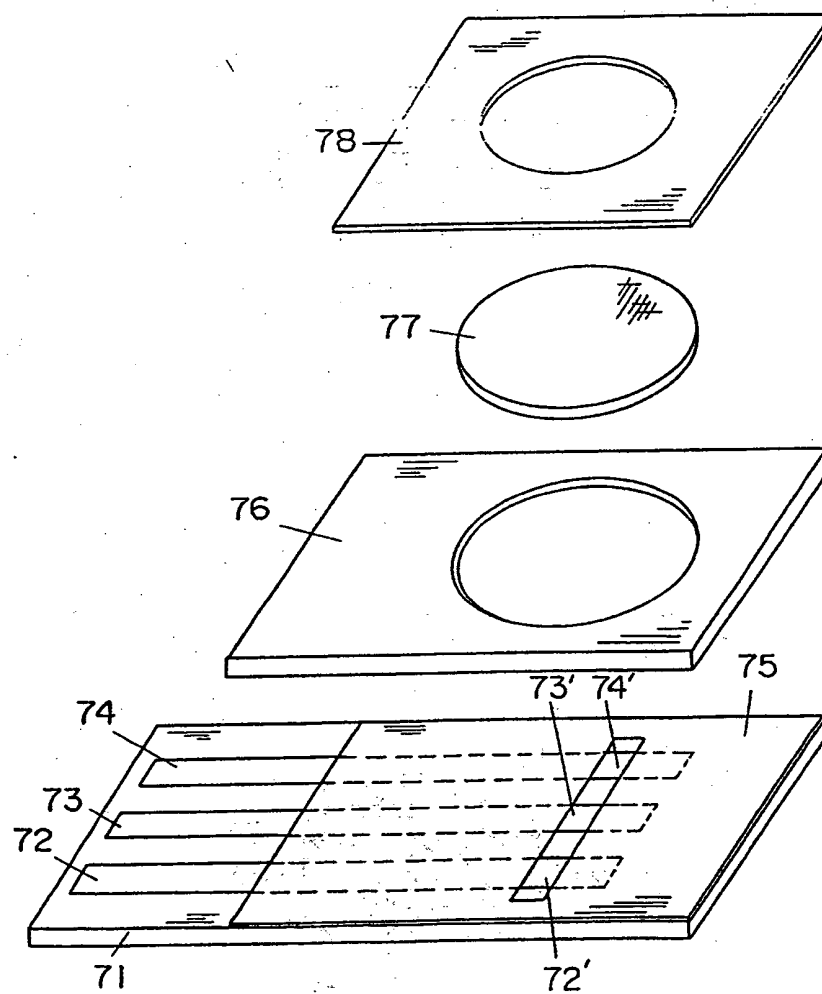


FIG. 2



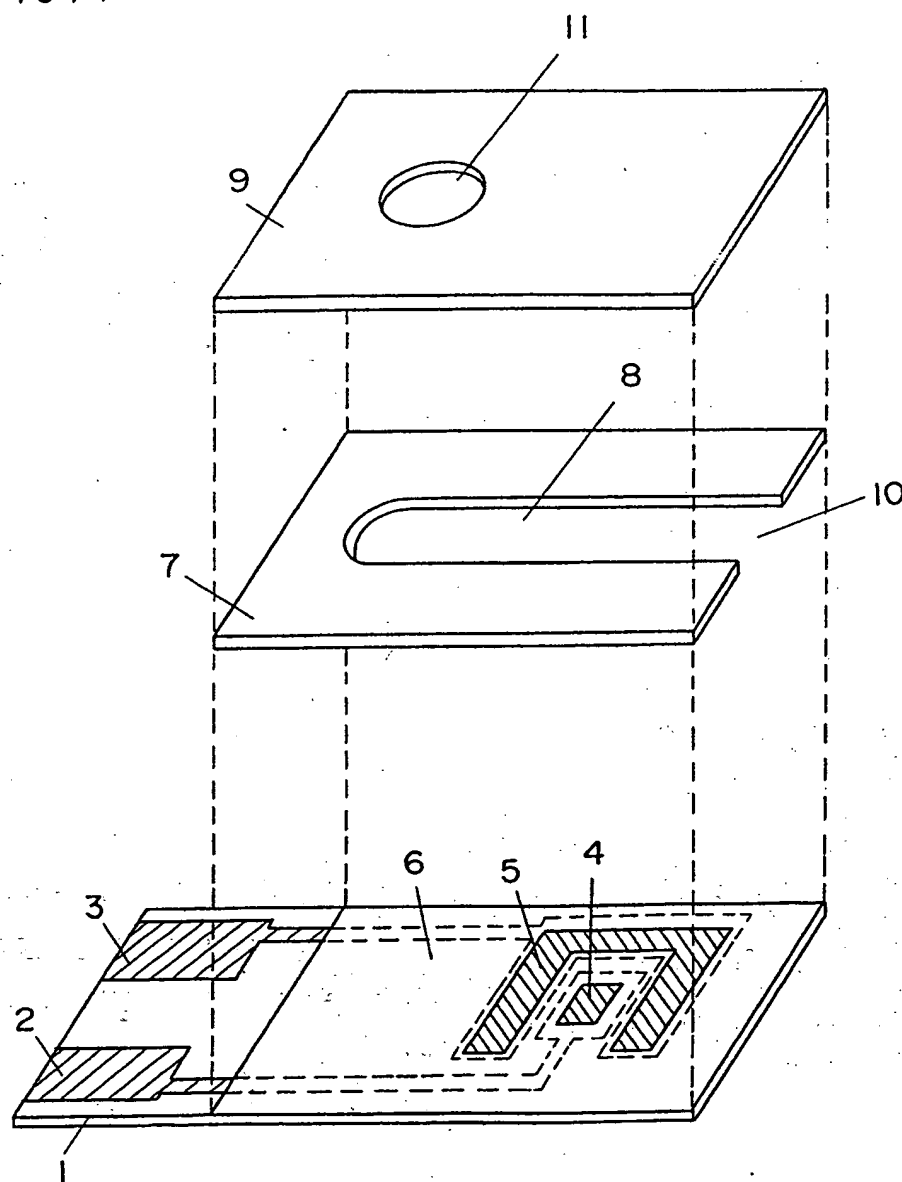
- 2/14 -

FIG. 3



- 3/14 -

FIG. 4



—4/14—

FIG. 5

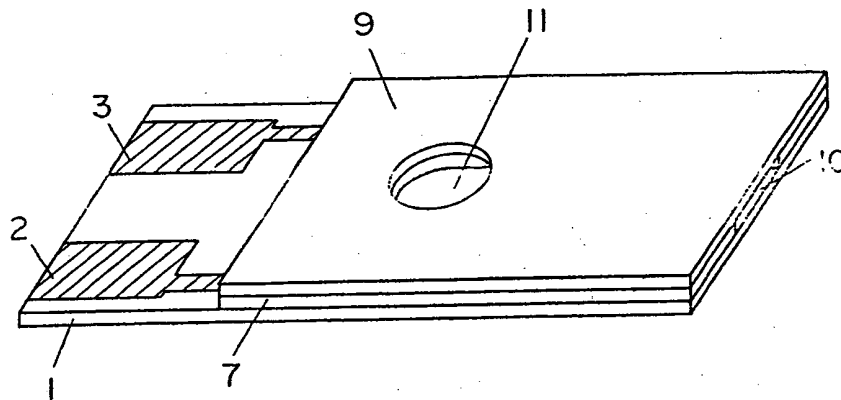
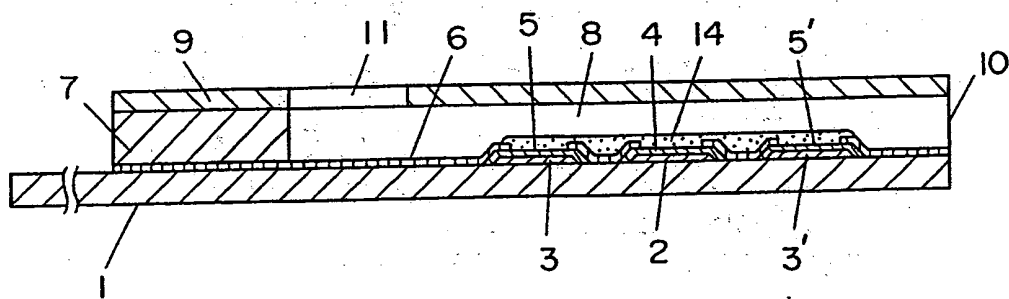
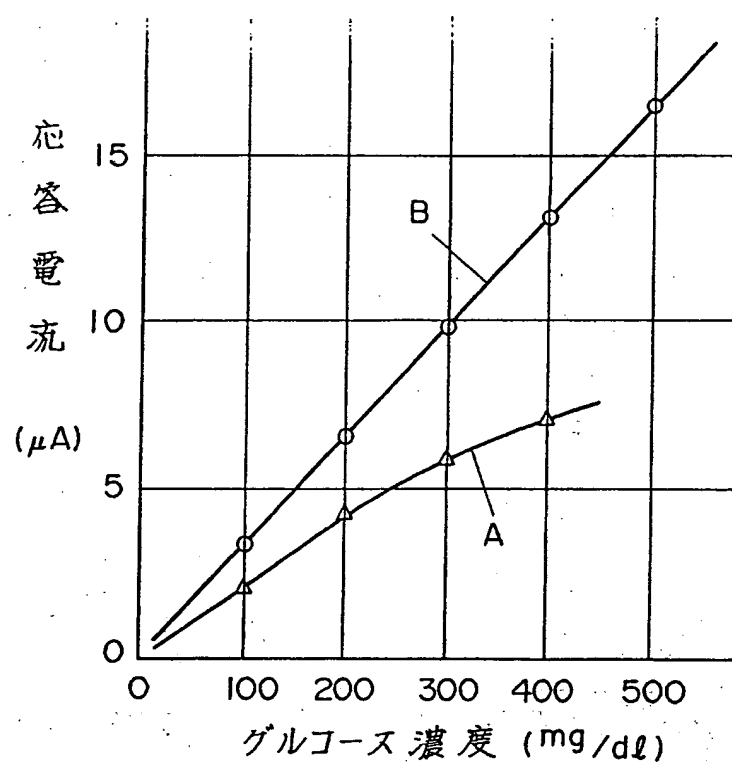


FIG. 6



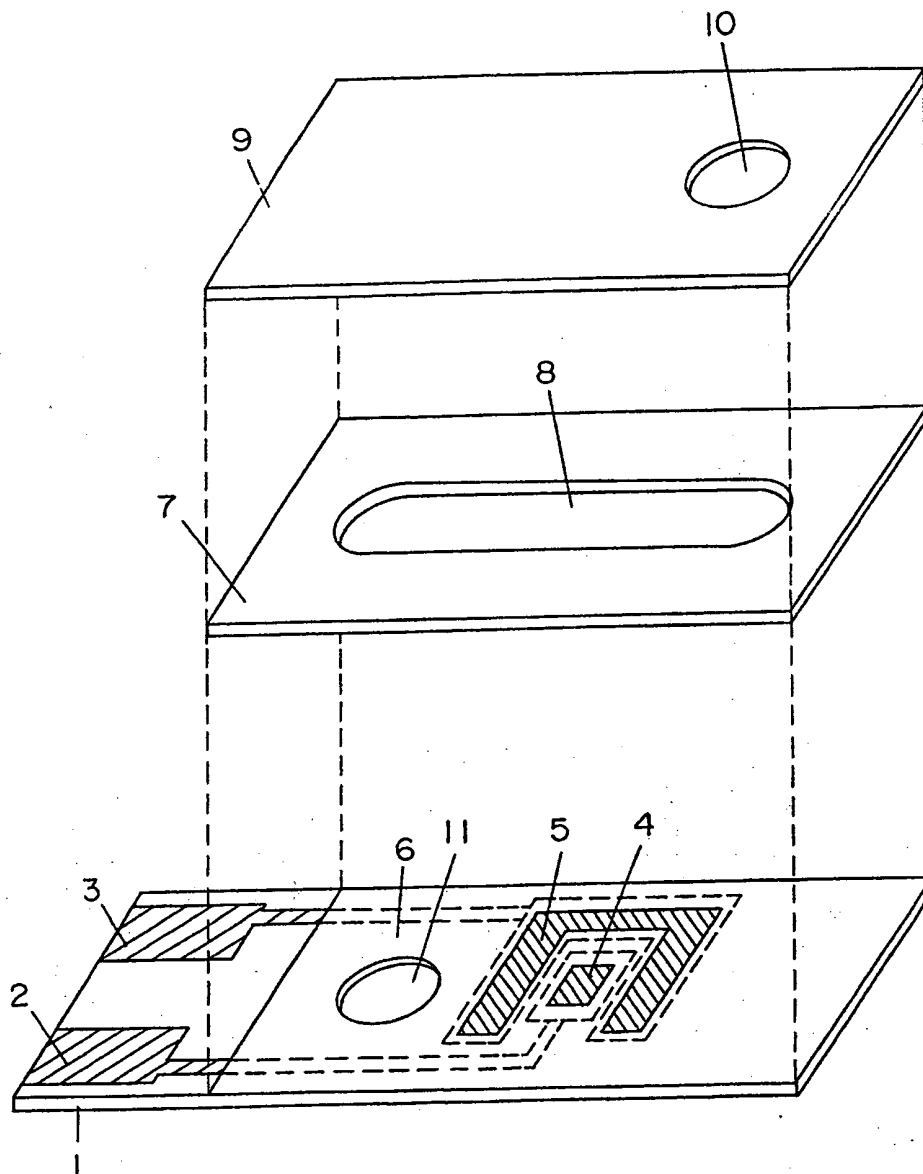
-5/14-

FIG. 7



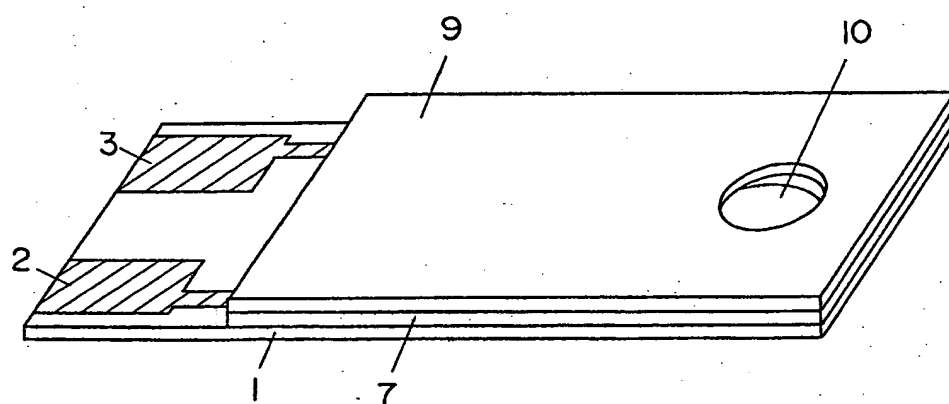
- 6/14 -

FIG. 8



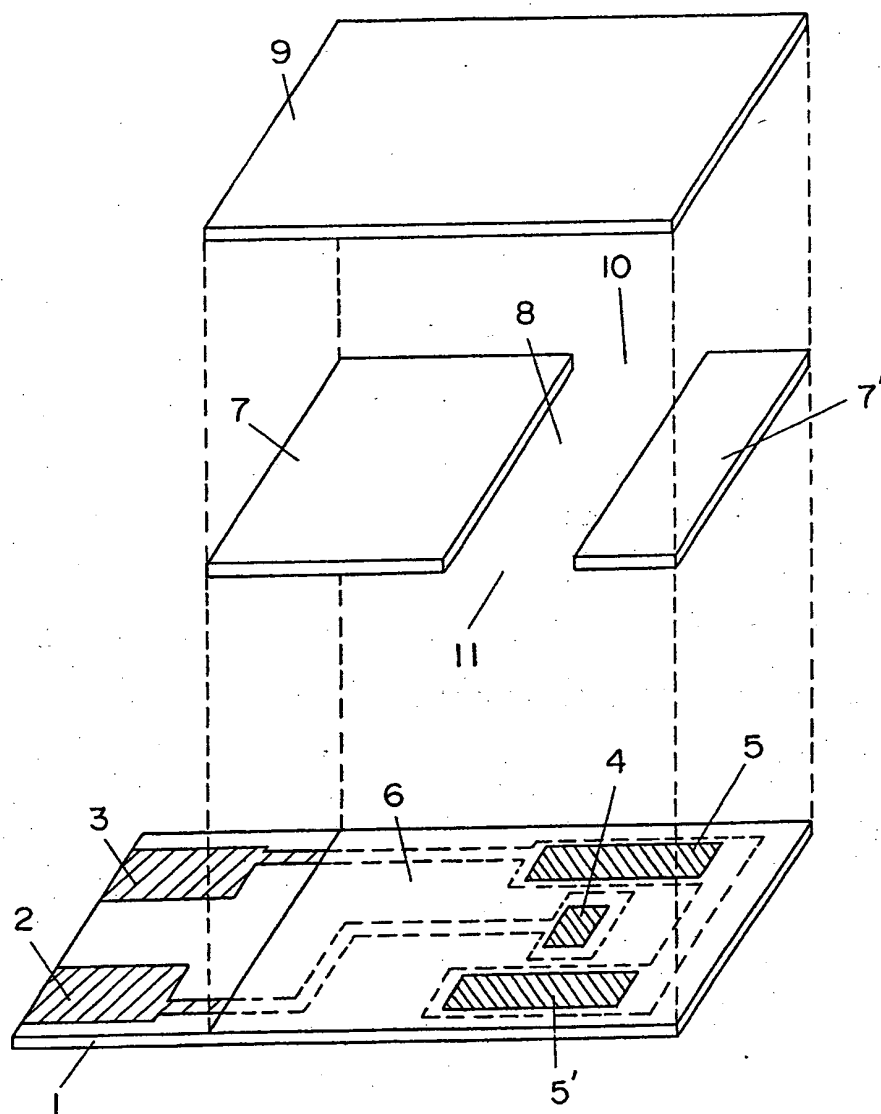
- 7/14 -

FIG. 9



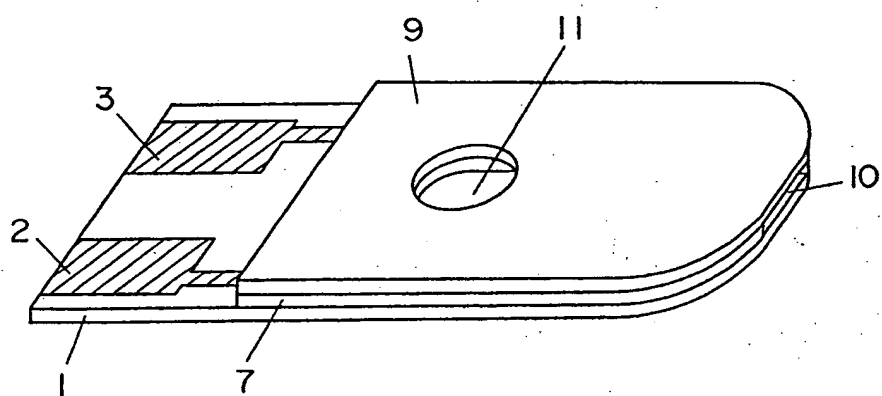
- 8/14 -

FIG. 10



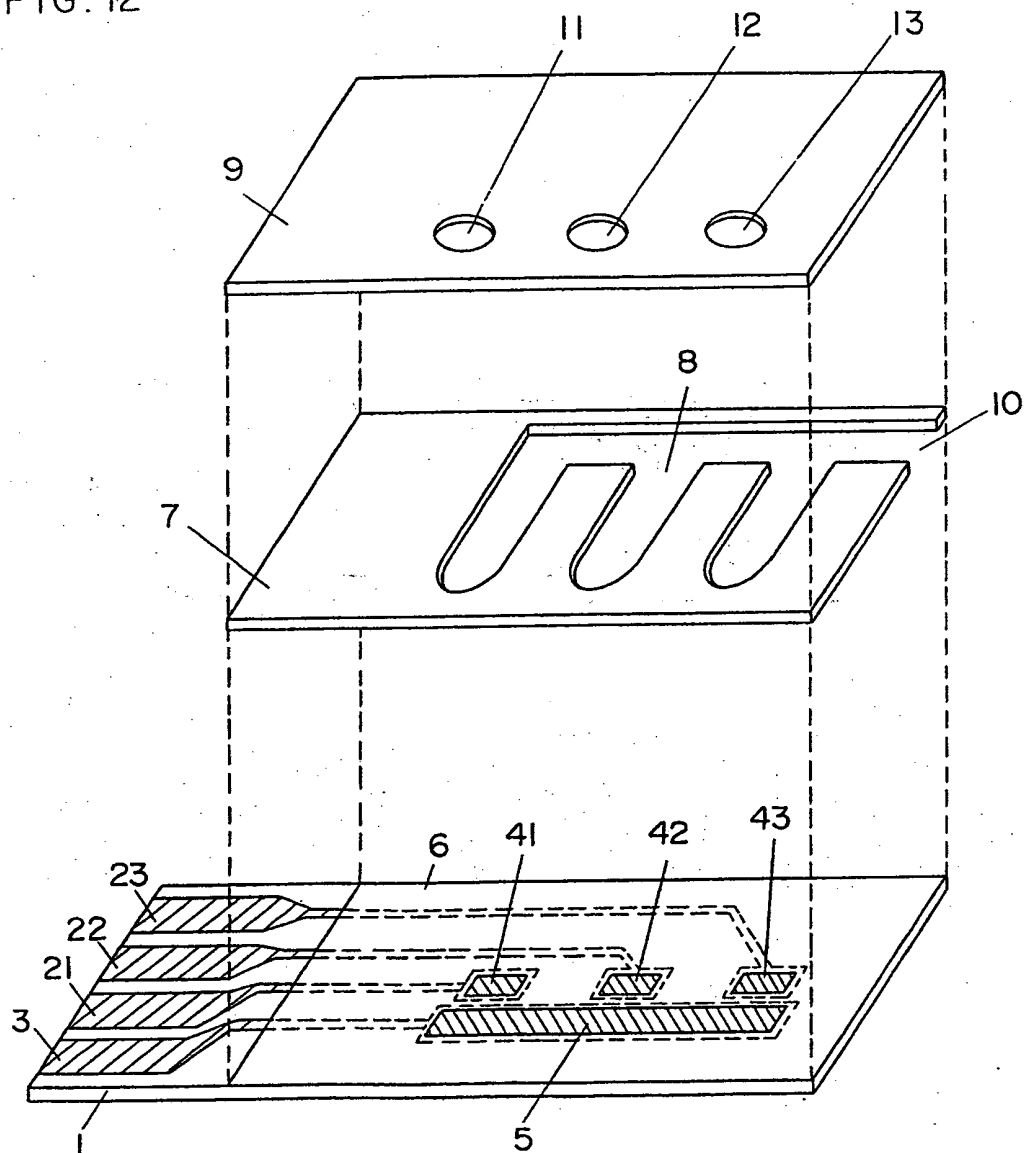
— 9/14 —

FIG. II



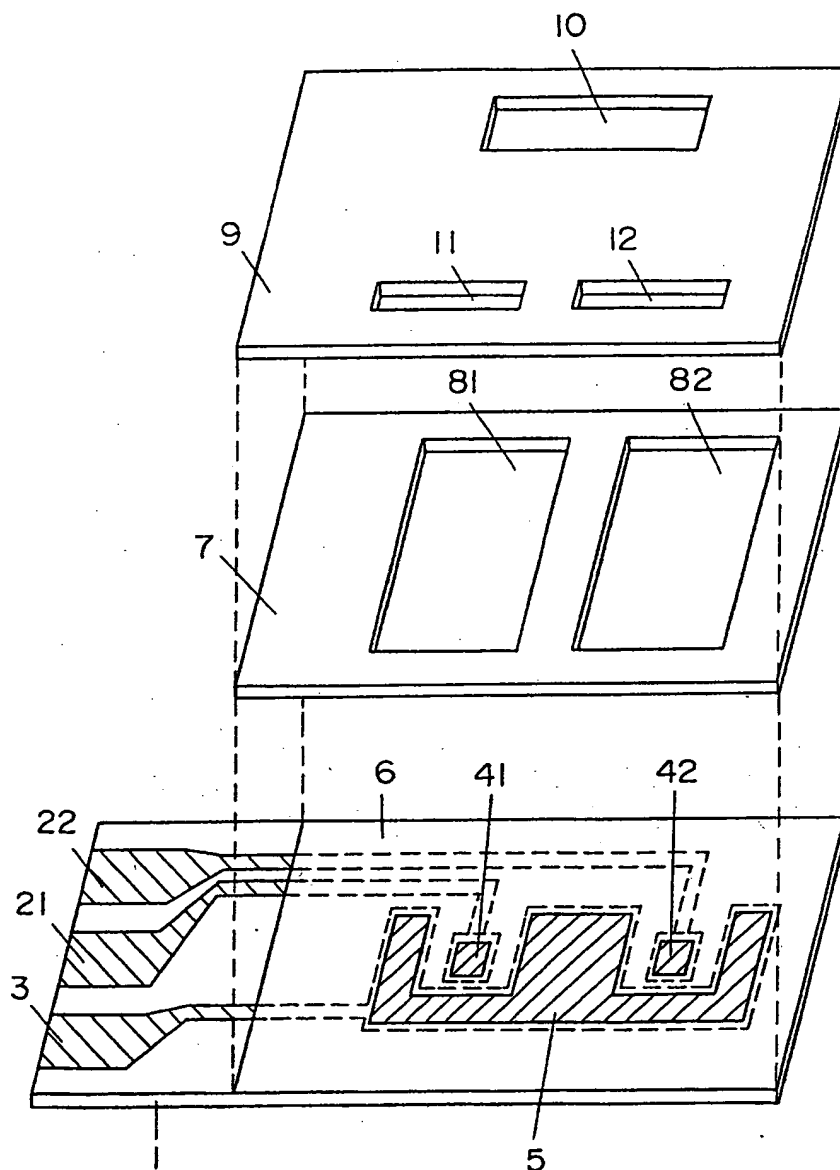
— 10/14 —

FIG. 12



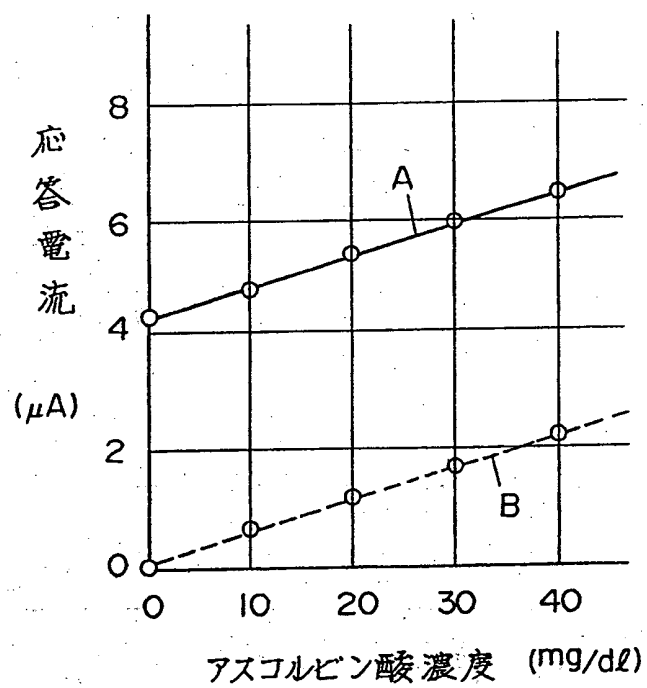
— 11/14 —

FIG. 13



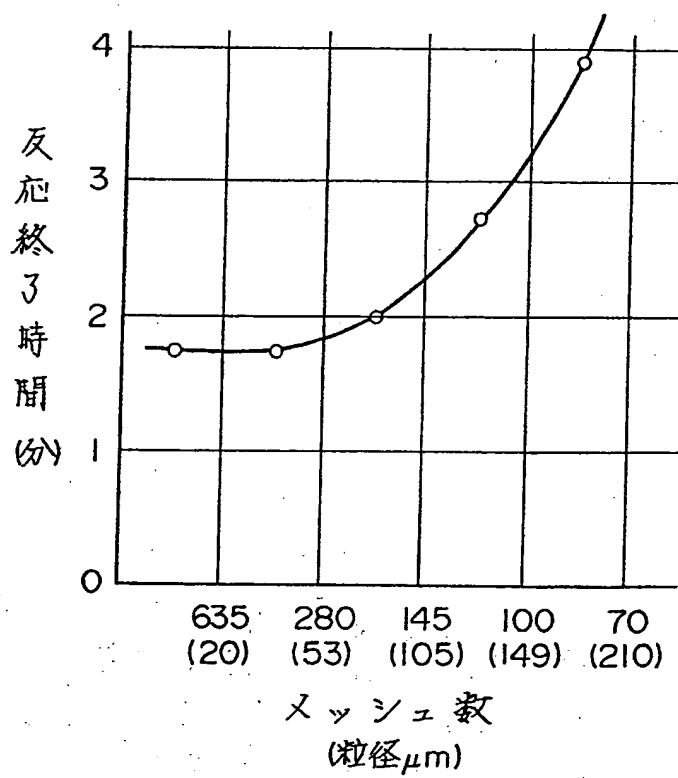
-12/14-

FIG. 14



- 13/14 -

FIG. 15



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/JP89/00337

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (If several classification symbols apply, indicate all) ⁶		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC		
Int. Cl ⁴ G01N27/28, G01N27/30		
II. FIELDS SEARCHED		
Minimum Documentation Searched ⁷		
Classification System	Classification Symbols	
IPC	G01N27/28-27/30, 27/46	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched ⁸		
Jitusyo Shinan Koho 1926 - 1989 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971 - 1989		
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT ⁹		
Category ¹⁰	Citation of Document, ¹¹ with Indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³
A	JP, A, 62-137559 (Matsushita Electric Ind. Co., Ltd.) 20 June 1987 (20. 06. 87) (Family: none)	1-18
A	JP, A, 63-3248 (Matsushita Electric Ind. Co., Ltd.) 8 January 1988 (08. 01. 88) (Family: none)	1-18
A	JP, A, 63-58149 (Matsushita Electric Ind. Co., Ltd.) 12 March 1988 (12. 03. 88) (Family: none)	1-18
<p>¹⁰ Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>		
IV. CERTIFICATION		
Date of the Actual Completion of the International Search		Date of Mailing of this International Search Report
June 26, 1989 (26. 06. 89)		July 10, 1989 (10. 07. 89)
International Searching Authority		Signature of Authorized Officer
Japanese Patent Office		

国 際 調 査 報 告

国際出願番号PCT/JP 89/ 00337

I. 発明の属する分野の分類			
国際特許分類 (IPC) Int. Cl. ⁴ G 0 1 N 2 7 / 2 8, G 0 1 N 2 7 / 3 0			
II. 国際調査を行った分野			
調 査 を 行 っ た 最 小 限 資 料			
分 類 体 系	分 類 記 号		
IPC	G 0 1 N 2 7 / 2 8 - 2 7 / 3 0, 2 7 / 4 6		
最小限資料以外の資料で調査を行ったもの			
日本国実用新案公報		1926-1989年	
日本国公開実用新案公報		1971-1989年	
III. 関連する技術に関する文献			
引用文献の カテゴリ ※	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示		請求の範囲の番号
A	JP, A, 62-137559 (松下電器産業株式会社) 20. 6月. 1987 (20. 06. 87) (ファミリーなし)		1-18
A	JP, A, 63-3248 (松下電器産業株式会社) 8. 1月. 1988 (08. 01. 88) (ファミリーなし)		1-18
A	JP, A, 63-58149 (松下電器産業株式会社) 12. 3月. 1988 (12. 03. 88) (ファミリーなし)		1-18
<div> <div> <p>※ 引用文献のカテゴリ</p> <p>「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技术水準を示すもの</p> <p>「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの</p> <p>「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)</p> <p>「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</p> <p>「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献</p> </div> <div> <p>「T」 国際出願日又は優先日の後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</p> <p>「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの</p> <p>「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの</p> <p>「&」 同一パテントファミリーの文献</p> </div> </div>			
IV. 証 証			
国際調査を完了した日 26. 06. 89		国際調査報告の発送日 10. 07. 89	
国際調査機関 日本国特許庁 (ISA/JP)		権限のある職員 特許庁審査官	2G 7.3.6.3 能 美 知 康 ㊞

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)